

РОЗРОБКА АНТИГЕНУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ РЕСПІРАТОРНОГО МІКОПЛАЗМОЗУ ПТИЦІ МЕТОДОМ ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ

Стегній Б.Т., Заремба І.А., Усова Л.П.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

Мікоплазмоз птиці є одним з ключових факторів ризику промислового птахівництва. За даними Асоціації птахівників України лише у 2010–2012 роках птахофабрики закупили по імпорту препаратів на суму більше 1 млн. доларів США, тоді як до 2000 року ця сума не перевищувала 100 тис. доларів [1]. Близько 60% препаратів, призначені для діагностики, профілактики та ліквідації мікоплазмозних інфекцій курей і індиків (респіраторного мікоплазмозу, мікоплазмозного синуситу та їх асоціацій з іншими інфекційними хворобами). Десятирічні дослідження, які проведені в ННЦ «ІЕКВМ», засвідчили, що в 2003–2011 роках превалентність *M. gallisepticum* за серологічними показниками в технологічних групах 1-добового молодняка й курей-несучок зросла, відповідно, у 2 та 5 рази. Отже завдання створення вітчизняних засобів для діагностичних досліджень щодо респіраторного мікоплазмозу у птахівництві України стає все більш актуальним.

Фахівцями ННЦ «ІЕКВМ» доведено, що серед декоративної птиці (курки, індички, фазани, голуби) серопозитивність становить (13–26) %, а мікоплазманосійство – (3–27) % особин. За умов утримання на обмеженій території птиці різних видів відбувається передача *M. gallisepticum* від типових (курки, індички, фазани) до нетипових (качки, гусаки, лебеді) хазяїв. При цьому серопозитивність у водоплавної птиці може сягати 12,7 %, мікоплазманосійство – 5,5 % від усього поголів'я. [2, 3]. Серологічні методи діагностики дозволяють виявляти птахів-мікоплазманосіїв на ранніх стадіях інфекційного процесу. Латентні мікоплазмоносії є головним джерелом інфекції в природі у декоративному та промисловому птахівництві. Тому важливим напрямком протиепізоотичної роботи є виявлення антитіл проти мікоплазмозних антигенів, які в перебігу персистентної інфекції накопичуються в цитологічній клітині зараженої птиці. Справа у тому, що зрілі клітини мікоплазм містять певний відсоток антигенного матеріалу біологічного господаря, через що у персистентно заражених курей та індиків розвивається феномен імунологічної толерантності до структурних, але не до «розчинних» антигенів мікоплазм [4].

Виходячи з зазначеного, метою наших досліджень була розробка регламенту виготовлення «розчинного» (не структурного) мікоплазмозного антигену та порівняння його активності у ELISA зі «структурним» (корпускулярним) антигеном мікоплазм.

Матеріали та методи досліджень. 1. *Культури мікроорганізмів* – музейний штам *Mycoplasma gallisepticum* S₆; епізоотичні ізоляти *M. gallisepticum*. Музейні штами мікоплазм зберігалися в лабораторії у нативному стані (у рідких поживних середовищах) за температури (4–8) °С [14]. Поживні середовища для культивування та ідентифікації мікоплазм готували на триптичному гідролізаті серцевих м'язів ВРХ з вмістом (180–220) мг % амінного азоту (за Зеренсен-Гавріловим) з додаванням 10 % гідролізату печінки ВРХ (з умістом (125–150) мг % амінного азоту), 5 % дріжджового аутолізату (з умістом загального білка (25–75) %), 0,5 % пептону, (15–20) % сироватки крові коня або альбуміну крові ВРХ, а також 0,025 % НАДФ-На. Також застосовували середовище Едварда, виготовлене за стандартною методикою.

2. *Виготовлення мікоплазмозних антигенів.* Для виготовлення клітинного (структурного) мікоплазмозного антигену бактерійну масу штамів мікоплазм накопичували у рідкому поживному середовищі із додаванням сироватки ВРХ. До пробірок з рідкими поживними середовищами вносили по 0,5 см³ 10-мільярдної суспензії штаму *M. gallisepticum* S₆ (MG S₆). Посіви інкубували 5 днів за температури (37±0,5) °С. Контроль інтенсивності росту здійснювали щодобово шляхом візуального огляду в проміні пронизуючого світла. На п'яту добу концентрацію бактеріальної маси мікоплазм визначали шляхом фотокалориметрії на приладі ФЕК «КФК-2 УХЛ-4» (зелений світлофільтр, довжина хвилі 420–440 нм). Також проводили мікроскопію мазків (фарбування за Романовським-Гімза).

Для виготовлення не структурних антигенів мікоплазми розмножували у культурах клітин: у перещеплюваній культурі клітин ембріону курей СЕФ, а також у первинно трипсинізованій культурі куриних фібробластів – ФЕК.

Антигени готували за трьома методиками.

Методика № 1. Культуру мікоплазм, що культивували у рідких поживних середовищах, знешкоджували шляхом додавання мертіолату (1:10000). Після цього бактерійну масу тричі піддавали центрифугуванню за режимом 5 тис. об./хв. протягом 20 хвилин. Надосад утилізували, а клітинну масу ресуспендували стерильним ФБФР та стандартизували до концентрації 30 млрд. м. т./см³. У такому вигляді клітинну масу використовували в якості антигену.

Методика № 2. Клітинну масу мікоплазм додатково піддавали детергенції ДСН у співвідношенні 1 мг ДСН на 1 мг білка, режим детергенції: 60 хвилин за температури (37–38) °С. Оброблений матеріал очищували шляхом діалізу впродовж двох діб за температури (2–8) °С проти ФБФР із додаванням ЕДТА (кінцева концентрація 0,01 %). Отриманий препарат використовували в якості антигену.

Методика № 3. Моношари перещеплюваної культури клітин і первинно трипсинізованої культури куриних фібробластів на 3-тню добу культивування переносили до флаконів і піддавали триразовому заморожуванню за температури до мінус 20 °С та наступному розморожуванню. Після цього суспензію освітлювали шляхом центрифугування за 5 тис. об./хв впродовж 15 хвилин.

Виготовлені антигени контролювали на відсутність контамінації сторонньою мікрофлорою відповідно до ДСТУ 4483, відсутність контамінації мікоплазмами – відповідно до ДСТУ 4613, повноту інактивації – за загальноприйнятими методиками.

3. *Референтні сироватки та польові проби.* За референтні слугували діагностичні сироватки з комерційних наборів виробництва «ВНІЗЖ» (РФ): гомологічна – проти *Mycoplasma gallisepticum*, та гетерологічна – проти *M. synoviae*, реовірусу курей (РВК), вірусів інфекційного ларинготрахеїту (ЛТТ), ньюкаслської хвороби (НХ), інфекційного бронхіту (ІБ) та інфекційної бурсальної хвороби курей (ІБХ).

Польові проби – сироватки курей зі стаціонарно неблагополучних щодо респіраторного мікоплазмозу господарств Східних і Південних регіонів України, які попередньо охарактеризовано як позитивні чи негативні за результатами кровокрапельної реакції аглютинації (ККРА).

4. *Серологічні реакції.* Використовували сироватко-крупинну реакцію аглютинації (СКРА) та імуноферментний аналіз (ІФА). Для постановки СКРА застосовували комерційний антиген Nobilis MG Antigen (фірми Intervet), експериментальні серії антигенів з штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆, виготовлені в лабораторії, та Антиген для діагностики сальмонельозів тварин групи Д в реакції аглютинації. Також застосовували позитивні гіперімунні сироватки проти *Mycoplasma gallisepticum* S₆, отримані на птиці та кролях; позитивні сальмонельозні монорецепторні сироватки серогруп 09 та 04; позитивну ієрсиніозну сироватку 09. Ці реакції ставили за стандартними методиками на предметних скельцях та у пробірках. Опрацювання результатів робили візуально, у променях проникаючого світла. СКРА обліковували через 2 хв.

Для постановки ІФА застосовували комерційний антиген Antigen MG виробництва фірми IDEXX (США) та експериментальні антигени, отримані як зазначено вище. Також використовували комерційні сироватки з комерційних наборів виробництва «ВНІЗЖ» (РФ) і польові проби сироваток, згадані вище, а також експериментальні антисироватки проти музейних штамів *M. gallisepticum* S₆ та *M. synoviae*. Сироватки випробовували в одному розведенні (1:400), у 4–8 повторях кожне. Антивидовий кон'югат комерційного виробництва KPL (Данія), у розведенні 1:200, субстрат «ТМВ», облік результатів ІФА проводили на рідері «SUNRISE» (сер. № 03930005708) у режимі поглинання оптичних хвиль довжиною D₄₅₀.

Експериментальні дослідження на тваринах проводили з урахуванням основних принципів біоетики у інфекційних віваріях 2-го рівня безпеки.

Результати досліджень. Встановлено, що концентрація загального білка в препаратах мікоплазмозних антигенів залежала від способу їх приготування. Найбільш концентрованими були антигени, виготовлені з бакмаси мікоплазм, що культивували за

методикою 2. Концентрація білка була на рівні 1200 мкг/см³ (за Бредфордом). «Розчинні» мікоплазмові антигени, що виділені з заражених перещеплюваної та первинно-трипсинізованої культур клітин ембріонів курей (методика 3) – мали на порядок нижчу концентрацію загального білку — 293 мкг/см³ та 327 мкг/см³ відповідно. Для сенсibiliзації планшетів експериментальні антигени використовували у концентраціях 1, 2 і 5 мкг/см³.

Серед «структурних» мікоплазмових антигенів специфічними в ІФА були лише антигени, виготовлені з клітинної маси, що отримали у рідкому середовищі та піддавали детергенції (таблиця 1).

Таблиця 1 – Результати контролю в ІФА активності та специфічності антигену з музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆, серія 3

	Розведення антигену		
	1 мкг/см ³	2 мкг/см ³	5 мкг/см ³
A	0,593±0,002	0,639±0,033	0,723±0,050
B	0,254±0,001	0,257±0,008	0,290±0,012
C	0,443±0,037	0,448±0,008	0,444±0,007

Примітки: 1. A – позитивна сироватка MG S₆ серія 01.07; 2. B – негативна сироватка; 3. C – позитивна сироватка щодо *M. synoviae* серія 02.07

З таблиці 1 видно, що антиген серії 3 найбільш специфічно реагував у сенсibiliзуючих дозах 2 і 5 мкг/см³: індекс специфічності, S/N = 2,49 у порівнянні з аналогічним індексом 2,36 у сенсibiliзуючій дозі 1 мкг/см³. Це свідчить про те, що оптимальна сенсibiliзуюча доза антигену серії 3 знаходиться у діапазоні концентрацій по білку від 2 до 5 мкг/см³. Також видно, що у всіх перевірених сенсibiliзуючих дозах антиген серії 3 майже однаково реагував з референтною сироваткою проти *M. synoviae*, що свідчить про його придатність для диференціації серологічного відклику курей на мікоплазми різних видів.

«Розчинний» мікоплазмовий антиген, що був виготовлений з зараженого моношару перещеплюваних клітин CEF (серії 7 та 8), реагував у ІФА з тими ж сироватками, що й у першому випадку (таблиця 1), значно специфічніше, ніж «структурні» мікоплазмові антигени (таблиця 2).

Таблиця 2 – Результати контролю активності та специфічності антигену з музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆, серія 8 (CEF)

	Розведення антигену		
	1 мкг/см ³	2 мкг/см ³	5 мкг/см ³
A	1,138±0,491	2,337±0,328	2,289±0,341
B	0,091±0,001	0,076±0,004	0,063±0,011
C	0,641±0,001	0,641±0,001	0,639±0,002

Примітки: 1. A – позитивна сироватка MG S₆ серія 01.07; 2. B – негативна сироватка; 3. C – позитивна сироватка проти *M. synoviae* серія 02.07

З таблиці 2 видно, що антиген серії 8 з наростанням концентрацій загального білка в діапазоні від 1 до 5 мкг/см³ проявляв зростаючу специфічність: у сенсibiliзуючій дозі 1 мкг/см³ його індекс специфічності становив S/N = 12,51, у дозі 2 мкг/см³ – 30,75, а в дозі 5 мкг/см³ – вже 36,33. Це, з одного боку, свідчить, що оптимум дозування у цьому діапазоні концентрацій білка ще не досягнуто, а з іншого – про достатньо високу питому вагу специфічних антигенів у загальній масі білка випробовуваного діагностикому. Дуже показово з огляду специфічності є реакція «розчинних антигенів» MG S₆ з референтною сироваткою проти *M. synoviae*, як і у випадку «структурного» антигену, у всіх сенсibiliзуючих дозах антиген серії 8 майже однаково реагував з референтною сироваткою проти *M. synoviae*, але рівень зв'язування антитіл проти *M. synoviae* був у 1,45 рази вищим. Це свідчить про широкий спектр специфічності «розчинного» антигену щодо антитіл проти мікоплазм різних видів, а також про можливість його використання для диференціації цих антитіл за рівнем активності їх зв'язування з досліджуваним діагностикомом.

Деякі інші властивості мав «розчинний» мікоплазмовий антиген, який виготовили з зараженого моношару первинно-трипсинізованих ФЕК (серія 9). Цей препарат реагував у ІФА з тими ж сироватками, що і у випадку антигену серії № 7 і 8 (таблиця 2), за різних сенсibiliзуючих доз більш «строкато», ніж мікоплазмові антигени, накопичені у культуральній системі ФЕК (таблиця 3).

Таблиця 3 – Результати контролю активності та специфічності антигену з музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆, серія 9 (ФЕК)

	Розведення антигену		
	1 мкг/см ³	2 мкг/см ³	5 мкг/см ³
A	1,051±0,011	0,792±0,378	1,092±0,126
B	0,071±0,016	0,163±0,451	0,133±0,019
C	0,847±0,001	0,869±0,001	0,954±0,011

Примітки: 1. A – позитивна сироватка MG S₆ серія 01.07; 2. B – негативна сироватка; 3. C – позитивна сироватка щодо MG S₆ серія 05.07

З таблиці 3 видно, що антиген серії 9 реагував з референтними позитивною (гомологічною) і негативною сироватками без лінійної залежності від сенсibiliзуючої дози у дослідженому діапазоні концентрацій за загальним білком (від 1 до 5 мкг/см³). Так, у сенсibiliзуючій дозі 1 мкг/см³ його індекс специфічності становив S/N = 14,80, у дозі 2 мкг/см³ – 4,86, а в дозі 5 мкг/см³ – 8,20. Це, з одного боку, може свідчити, що оптимум дозування цього антигену знаходиться в діапазоні концентрацій за загальним білком до 1,0 мкг/см³. З іншого боку, можливо адсорбуючі властивості антигенного комплексу мікоплазм, отриманих у культуральній системі ФЕК взагалі не дозволяють отримати лінійної залежності результатів ІФА від концентрації антигену через нетривкий зв'язок з поверхнею твердої фази ІФА.

У таблиці 4 наведено результати порівняльного вивчення специфічності «розчинних» мікоплазмових антигенів в ІФА за їх сенсibiliзуючої дози 1 мкг/см³, з використанням панелі 10 проб сироваток крові курей різного походження.

Таблиця 4 – Результати контролю активності та специфічності антигенів з музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆ серії 8, 9

Діагностичні сироватки	Антигени з музейного штаму <i>Mycoplasma gallisepticum</i> S ₆	
	CEF (серія 8)	ФЕК (серія 9)
A	0,943±0,015	0,878±0,014
B	0,085±0,009	0,055±0,001
C	0,351±0,032	0,431±0,211
D	0,251±0,001	0,191±0,001
E	0,106±0,001	0,086±0,001
F	0,111±0,002	0,086±0,001
G	0,099±0,004	0,101±0,021
H	0,046±0,002	0,049±0,001
I	0,044±0,003	0,051±0,001
J	0,122±0,001	0,126±0,001

Примітки: Розведення антигену – 1 мг/мл; робоче розведення сироваток – 1:400; робоче розведення кон'югату – 1:200; **A** – позитивна сироватка MG S₆ серія 01.07; **B** – негативна сироватка; **C** – позитивна сироватка *M. syuloviae* серія 02.07; **D** – позитивна сироватка щодо ньюкаслської хвороби (серія 27); **E** – позитивна сироватка щодо інфекційного бронхіту курей (серія 38); **F** – позитивна сироватка щодо інфекційного бронхіту курей ІБК (серія 42); **G** – позитивна сироватка щодо синдрому зниження несучості; **H** – позитивна сироватка щодо пневмовірусу птиці; **I** – позитивна сироватка щодо реовірусу птиці; **J** – позитивна сироватка щодо аденовірусу птиці.

Отримані результати дозволяють встановити показник «cut-off» для антигену серії № 8 («CEF-варіант», сенсibiliзуюча доза 1 мг/мл) у діапазоні D₄₅₀ 0,044–0,251 щодо негативних і гетерологічних проб і на рівні D₄₅₀ ≤0,300 та D₄₅₀ ≥0,500 щодо проб з антитілами проти гетерологічних мікоплазм птиці. Як видно з таблиці 5 «cut-off» для антигену серії № 9 («ФЕК-варіант», сенсibiliзуюча доза 1 мг/мл) знаходиться в діапазоні D₄₅₀ 0,049–0,191 щодо негативних і гетерологічних проб і на рівні D₄₅₀ ≤0,380 та D₄₅₀ ≥0,600 щодо проб з антитілами проти гетерологічних мікоплазм птиці.

Використання в ІФА розробленого на основі «CEF-технології» мікоплазмозового антигену для скринінгових досліджень 79 польових проб сироваток крові курей та індиків дозволило виявити позитивних сироваток на 13 % більше ніж за допомоги комерційного тест-набору для ELISA та на 43 % більше, ніж ККРА.

Отримані дані свідчать про перспективність використання внутрішньоклітинних розчинних антигенів мікоплазм для удосконалення моніторингу респіраторного мікоплазмозу курей та індиків.

У подальшому планується провести виробничі випробування набору ІФА для визначення його активності та специфічності.

Висновки. 1. Розроблено регламент приготування та застосування в ІФА внутрішньоклітинних розчинних антигенів мікоплазм на основі використання моношарових культур ембріональних клітин курей.

2. Використання в ІФА розробленого на основі «CEF-технології» мікоплазмозового антигену для скринінгових досліджень польових проб сироваток крові курей та індиків дозволило виявити позитивних сироваток на 13 % більше ніж за допомоги комерційного тест-набору для ELISA та на 43 % більше, ніж ККРА.

3. Встановлено, що антигени, виготовлені з музейного штаму *Mycoplasma gallisepticum* S₆ за методикою, що включала накопичення клітинної маси у рідкому середовищі з подальшою детергенцією та антиген з клітинної маси, що отриманий на культурі клітин CEF, є найбільш специфічними та активними для СКРА та ІФА.

Список літератури

1. Асоціація птахівників України. Аналіз закупок по імпорту. Київ-2013 [Електронний ресурс]. – Режим доступу : <http://ua-info.biz/legal/baseae/ua-atemer/str3.htm>. – Заголовок з екрану.
2. Результати епізоотологічного моніторингу щодо мікоплазма галлісептікум-інфекції та бактеріальних хвороб на території України [Текст] / О.В. Обуховська [та ін.] // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2010. – Вип. 94. – С. 182–185.
3. Аналіз епізоотичної ситуації щодо бактеріальних хвороб птиці в птахогосподарствах Харківської області [Текст] / О.В. Обуховська [та ін.] // Пробл. зооінженерії та вет. медицини : зб. наук. пр. / ХДЗВА. – Х., 2009. – Вип. 19, т. 1, ч. 2. – С. 123–128.
4. Ley, D.H. *Mycoplasma gallisepticum* infection [Text] / D.H. Ley, Y.M. Saif // Diseases of poultry, – 11th ed. – Blackwell Publishing, Ames, IA, 2003. – P. 722–744.
5. Glisson, J.R. *Mycoplasmosis in laying hens* [Text] / J.R. Glisson // Poultry Dis. – 1988. – Vol. 47, № 560. – P. 493–495.
6. Епанова, Е.Л. Респіраторний мікоплазмоз в господарствах м'ясного птицеводства АР Крим [Текст] / Е.Л. Епанова // Вет. медицина : міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2009. – Вип. 92. – С. 183–186.
7. Anon, N. *Mycoplasma today* [Text] / N. Anon // Poultry Tribune. – 1989. – Vol. 95, № 2. – P. 34.

DEVELOPMENT OF ANTIGEN FOR DIAGNOSIS RESPIRATORY AVIAN MYCOPLASMOSIS BY ELISA

Stegniy B.T., Zaremba I.A., Usova L.P.

National Scientific Centre "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv

The article presents data on obtaining antigen *Mycoplasma gallisepticum* S₆ on cell cultures. It was established that the most specific and active antigen was getting on cell culture CEF.